

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :  C12N 15/10		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/34463  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02248	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).		
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juli 1999 (23.07.99)	(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): INVITEK GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): HILLEBRAND, Timo [DE/DE]; Bansiner Strasse 60, D-12619 Berlin (DE). BENDZKO, Peter [DE/DE]; Ifflandstrasse 32, D-12623 Berlin (DE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	(54) Titel: FORMULATIONS AND METHODS FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS FROM ANY COMPLEX STARTING MATERIAL AND SUBSEQUENT COMPLEX GENETIC ANALYSIS  (54) Bezeichnung: FORMULIERUNGEN UND VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN AUS BELIEBIGEN KOMPLEXEN AUSGANGSMATERIALIEN UND NACHFOLGENDE KOMPLEXE GENANALYTIK  (57) Abstract  The invention relates to formulations without chaotropic components for isolating nucleic acids, notably DNA from any quantity of any complex starting material, by bonding to a solid phase. The formulations contain a lysis/bonding buffer system presenting at least one antichaotropic salt component, a solid phase and known washing and elution buffers. The lysis/bonding buffer system can be an aqueous solution or a solid formulation in ready-to-use reaction vessels. As the solid phase any support materials are suitable which are used for isolation by means of chaotropic reagents, such as, preferably, glass-fibre matting, glass membranes, silicon supports, ceramic materials, zeolites or materials having negatively functionalized surfaces or chemically modified surfaces which can be given a negative charge potential. The invention further relates to a method for isolating nucleic acids, notably DNA, from any complex starting materials by using the formulations provided for in the invention. Said method is characterized by the following: lysis of the starting material, bonding of the nucleic acids to a support material, washing of the nucleic acids bound to said support and elution of the nucleic acids.  (57) Zusammenfassung  Gegenstand der Erfindung sind Formulierungen ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien und Mengen enthaltend ein Lyse/Bindungspuffersystem, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist, eine feste Phase und an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer. Das Lyse/Bindungspuffersystem kann als wässrige Lösung vorliegen oder als feste Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäß. Als feste Phase können alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotroper Reagenzien Anwendung finden, vorzugsweise Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger, Keramiken, Zeolithe oder Materialien, die negativ funktionalisierte Oberflächen besitzen oder chemisch modifizierte Oberflächen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung der erfundungsgemäßen Formulierungen, das durch Lyse des Ausgangsmaterials, Bindung der Nukleinsäuren an ein Trägermaterial, Waschung der am Träger gebundenen Nukleinsäuren und Elution der Nukleinsäuren gekennzeichnet ist.		

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Formulierungen und Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien und nachfolgende komplexe Genanalytik**

**Beschreibung**

5

Gegenstand der Erfindung sind Formulierungen ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien und Mengen enthaltend ein Lyse/Bindungspuffersystem, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist. 10 eine feste Phase und an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer. Das Lyse/Bindungspuffersystem kann als wässrige Lösung vorliegen oder als feste Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäß. Als feste Phase können alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotroper Reagentien Anwendung finden, vorzugsweise Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger Keramiken, Zeolithe 15 oder Materialien, die negativ funktionalisierte Oberflächen besitzen oder chemisch modifizierte Oberflächen aufweisen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können.

20

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung der erfindungsgemäßen Formulierungen, das durch Lyse des Ausgangsmaterial, Bindung der Nukleinsäuren an ein Trägermaterial, Waschung der am Träger gebundenen Nukleinsäuren und Elution der Nukleinsäuren gekennzeichnet ist, wobei ggf. die nachfolgende Amplifikation von ausgewählten Sequenzabschnitten und ggf. 25 eine nachfolgende Analyse der vervielfältigten Genabschnitte in ein und der selben Reaktionskavität durchgeführt werden kann. Die Anwendungsgebiete der Verfahren sind alle mit DNA-Isolierungen sich beschäftigenden Laboratorien, wie forensische Medizin, Lebensmitteldiagnostik, medizinische Diagnostik, Molekularbiologie, Biochemie, Gentechnik und alle anderen angrenzenden Gebiete.

30

Unter klassischen Bedingungen erfolgt die Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben dadurch, daß die Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, teilweise auch unter Verwendung von proteinabbauenden Enzymen aufgeschlossen, die austretenden Nukleinsäurefraktionen 35 über Phenol-/Chloroform-Extraktionsschritte gereinigt und die Nukleinsäuren mittels Dialyse oder Ethanolpräzipitation aus der wässrigen Phase gewonnen werden (Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning" ).

Diese "klassischen Verfahren" zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen und besonders aus Geweben sind sehr zeitaufwendig (teilweise länger als 48 h ), erfordern einen erheblichen apparativen Aufwand und sind darüber hinaus auch nicht unter 5 Feldbedingungen realisierbar. Außerdem sind solche Methoden auf Grund der verwendeten Chemikalien wie Phenol und Chloroform in einem nicht geringen Maße gesundheitsgefährdend.

10 Verschiedene alternative Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen biologischen Ausgangsmaterialien ermöglichen die aufwendige und gesundheitsschädigende Phenol-/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren zu umgehen sowie eine Reduzierung der zeitlichen Aufwendungen zu erreichen.

15 Alle diese Verfahren basieren auf einer von Vogelstein und Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615-619) entwickelten und erstmals beschriebenen Methode zur präparativen und analytischen Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Die Methode kombiniert die Auflösung der die zu isolierende DNA- Bande enthaltende Agarose in einer gesättigten Lösung eines chaotropen Salzes (NaJ) mit einer Bindung der DNA an Glaspartikel. Die an die Glaspartikel fixierte DNA wird anschließend mit einer 20 Waschlösung (20 mM Tris HCl [pH 7,2]; 200mM NaCl; 2 mM EDTA; 50% v/v Ethanol) gewaschen und danach von den Trägerpartikeln abgelöst.

25 Diese Methode erfuhr bis heute eine Reihe von Modifikationen und wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt für unterschiedliche Verfahren der Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Herkünften angewendet (Marko, M.A., Chipperfield, R. und Birnboim, H.G., 1982, Anal. Biochem., 121, 382-387).

30 Darüber hinaus existieren heute weltweit auch eine Vielzahl von Reagenziensystemen, vor allem zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und für die Isolierung von Plasmid DNA aus bakteriellen Lysaten, aber auch für die Isolierung von längerkettigen Nukleinsäuren (genomische DNA, zelluläre Gesamt-RNA) aus Blut, Geweben oder auch Zellkulturen .

35 Alle diese kommerziell verfügbaren Kits basieren auf dem hinlänglich bekannten Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger unter Anwesenheit von Lösungen unterschiedlicher chaotroper Salze und verwenden als Trägermaterialien Suspensionen feingemahlener Glaspulver (z.B. Glasmilk , BIO 101, La Jolla, CA), Diatomenerden

(Fa.Sigma) oder auch Silicagele. (Diagen, DE 41 39 664 A1).

Ein für eine Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen praktikables Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren ist in US 5,234,809 (Boom) dargestellt. Dort ist ein  
5 Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus nukleinsäurehaltigen Ausgangsmaterialien durch die Inkubation des Ausgangsmaterials mit einem chaotropen Puffer und einer DNA-bindenden festen Phase beschrieben. Die chaotropen Puffer realisieren sowohl die Lyse des Ausgangsmaterials als auch die Bindung der Nukleinsäuren an die feste Phase. Das Verfahren ist gut geeignet, um Nukleinsäuren aus kleinen Probenmengen zu isolieren und  
10 findet speziell im Bereich der Isolierung viraler Nukleinsäuren seine praktische Anwendung.

15 Spezifische Modifikationen dieser Verfahren betreffen den Einsatz von neuartigen Trägermaterialien, welche für bestimmte Fragestellungen applikative Vorteile zeigen (Invitek GmbH WO-A 95/34569).

Entscheidende Nachteile von Verfahren der Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien auf der Basis der Inkubation des Ausgangsmaterials mit einem chaotropen Puffer und einer festen Phase bestehen aber u.a. darin, daß der durch die  
20 chaotropen Puffer zu realisierende Zellaufschluß nicht für alle Materialien einsetzbar ist bzw. auch für größere Mengen an Ausgangsmaterialien nur extrem ineffizient und unter einem großen Zeitaufwand funktioniert. Darüber hinaus sind mechanische Homogenisierungsverfahren notwendig, wenn z.B. DNA aus Gewebeproben isoliert  
25 werden soll. Weiterhin müssen für verschiedene Fragestellungen auch immer verschiedene hohe Konzentrationen unterschiedlicher chaotroper Puffer eingesetzt werden. Das Verfahren ist damit in keiner Weise universell einsetzbar.

Probleme, die durch eine ggf. schwierige Lyse des Ausgangsmaterials entstehen, können  
30 durch eine Reihe von kommerziell verfügbaren Produkten für die Nukleinsäureisolierung (speziell für die Isolierung genomicscher DNA aus komplexen Ausgangsmaterialien) zwar gelöst werden, haben aber den großen Nachteil, daß es sich nicht mehr um ein klassisches „Single Tube“-Verfahren handelt, das das Verfahren gemäß US-Patent kennzeichnet, da die Lyse des Ausgangsmaterials in einem gebräuchlichen Puffer unter Einbeziehung eines proteolytischen Enzyms erfolgt. Die für die nachfolgende Bindung der Nukleinsäuren an  
35 z.B. Zentrifugationsmembranen notwendigen chaotropen Ionen müssen nach erfolgter Lyse dem Lyseansatz extra zugegeben werden. Sie können aber nicht Bestandteil des Lysepuffers sein, da die proteinzerstörende Funktion chaotroper Salze bekannt ist und

natürlich sofort das für eine effiziente Lyse notwendige proteolytische Enzym ebenfalls zerstören würde.

5 Trotz einer Reihe von Nachteilen haben sich deshalb die Methoden der Nukleinsäureisolierung unter der Verwendung chaotoper Salze weltweit durchgesetzt und werden mittels kommerziell verfügbarer Produkte millionenfach eingesetzt. Diese Systeme sind extrem einfach in ihrer Durchführung und verfahren immer nach dem Prinzip der Lyse des Ausgangsmaterials, der nachfolgenden Bindung der Nukleinsäure an die feste Phase einer Glas- oder Silikamembran, welche sich in einem Zentrifugationssäulchen an 10 einer Trägersuspension befindet, dem Waschen der gebundenen Nukleinsäuren und der nachfolgenden Elution der Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer Ionenstärke.

15 Alle diese Systeme beruhen auf der Bindung der Nukleinsäuren an die jeweiligen Trägeroberflächen in Anwesenheit chaotoper Salze, d.h. mindestens eine Pufferlösung enthält als Hauptkomponente ein chaotropes Salz. Dies betrifft u.U. schon den Lysepuffer oder bei Systemen unter Einbeziehung proteolytischer Enzyme einen notwendigen Bindungspuffer, welcher nach der erfolgten Lyse des Ausgangsmaterials zugegeben wird.

20 Die Basis für chaotropen Salze sind die Reihen von Hofmeister zur Aussalzung von negativ geladenen, neutralen oder basischen Eiweißlösungen. Die chaotropen Salze sind dadurch charakterisiert, Proteine zu denaturieren, die Löslichkeit unpolarer Substanzen in Wasser zu erhöhen sowie hydrophobe Wechselwirkungen zu zerstören. Gerade diese Eigenschaften bewirken nach dem Stand der Technik auch mit Puffersystemen chaotropen 25 Salze die übergeordnete Struktur des wässrigen Millieus zu zerstören um so die Bindung der Nukleinsäuren an ausgewählte feste Phasen zu vermitteln. Die bekanntesten Vertreter zur Nukleinsäureisolierung sind, Natriumperchlorat, Natriumjodid, Kaliumjodid, Guanidiniothiocyanat und Guanidinhydrochlorid. Sie sind jedoch zum einen kostenintensiv und zum anderen teilweise toxisch oder ätzend.

30 Auf diesem Stand der Technik existieren bis zum heutigen Tag eine sehr große Anzahl an Patentanmeldungen sowie an erteilten Patente, wobei es sich dabei immer um Verfahrensvarianten handelt, wie z.B. die Verwendung neuer Trägermaterialien oder effizientere Waschpuffer etc., wobei das Grundprinzip immer die Verwendung chaotoper Salze zur Bindung an eine feste Phase aus Silicamaterialien darstellt.

35

Das physiko-chemische Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger in Anwesenheit chaotoper Salze gilt in der internationalen Fachwelt als erklärt. Die Bindung

der Nukleinsäuren an die Oberflächen der mineralischen Träger bestehen in der Störung übergeordneter Strukturen des wässrigen Millieus, durch welche die Nukleinsäuren an die Oberfläche von mineralischen Materialien, insbesondere von Glas- bzw. Silicapartikeln adsorbieren. Zur Störung der übergeordneten Strukturen des wässrigen Millieus ist immer 5 die Anwesenheit chaotroper Ionen erforderlich. Bei hohen Konzentrationen der chaotropen Salze verläuft die Reaktion fast quantitativ. Aufgrund dieser beschriebenen physiko-chemischen Erkenntnisse geht deshalb die Fachwelt davon aus, daß alle kommerziell 10 verfügbaren Systeme zur Isolierung von Nukleinsäuren, Pufferkompositionen mit hohen Ionenstärken chaotroper Salze, für die Bindung von Nukleinsäuren an eine Nukleinsäuren-bindende feste Phase enthalten müssen.

Um so überraschender war die erfindungsgemäße Erkenntnis, daß Formulierungen, die 15 antichaotrope Salze in einem Lyse/Bindungspuffersystem enthalten, ebenfalls und besser zur Isolierung von Nukleinsäuren aus beliebigen, insbesondere komplexen Ausgangsmaterialien geeignet sind.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Gegenstand der Erfindung sind deshalb Formulierungen und Verfahren ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von 20 Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien, die ein Lyse/Bindungspuffersystem, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist, eine feste Phase und an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer enthalten.

Antichaotrope Komponenten im Sinne der Erfindung sind Ammonium-, Cäsium-, 25 Natrium- und/oder Kaliumsalze, vorzugsweise Ammoniumchlorid.

Das Lyse/Bindungspuffersystem weist außerdem an sich bekannte Detergenzien und ggf. Zusatzstoffe auf, so z.B. Tris-HCl, EDTA, Polyvinylpyrrolidone, CTAB, TritonX-100, N-Lauryl-Sarkosin, Natriumcitrat, DTT, SDS und/oder Tween. In einer bevorzugten 30 Ausführungsvariante enthält das Lyse/Bindungspuffersystem zur Bindung an die feste Phase einen Alkohol, wie z.B. Ethanol und Isopropanol und ggf. Enzyme, vorzugsweise Protein-abbauende Enzyme, z.B. eine Proteinase.

Mit der Erfindung kann das dem Stand der Technik entsprechende Prinzip ausgenutzt 35 werden, ein spezifisches Problem der Nukleinsäureisolierung zu lösen, bzw. eine bestehende Variante hinsichtlich bestimmter relevanter Parameter zu optimieren und effektivieren. So ist es für die Durchführung als vollautomatisiertes high-throughput-

Verfahren geeignet.

Völlig unerwartet und überraschend können im Unterschied zum bekannten Stand der Technik gemäß vorliegender Erfindung mit Lyse/Bindungspuffersystemen ohne den Bestandteil von chaotropen Salzen Nukleinsäuren, insbesondere genomische DNA an ein mineralisches Trägermaterial gebunden werden und unter den üblichen Reaktionsbedingungen auch eluiert werden.

Es wurde weiterhin gefunden, daß eine Vielzahl ganz unterschiedlicher Salze als Bestandteile von ggf. auch an sich üblichen Lyse/Bindungspuffersystemen für die Bindung von Nukleinsäuren an klassische Trägermaterialien auf Basis von Glas oder Silica ausreichend sind.

Besonders überraschend können die besten Ergebnisse mit Salzen erreicht werden, welche nach ihren chemisch-physikalischen Charakteristika die absolut entgegengesetzten Wirkungen in bezug auf die für die Nukleinsäurebindung bisher verwendeten chaotropen Salze aufweisen. Man kann diese Salze somit als antichaotisch bezeichnen.

So konnten mit Lyse/Bindungspuffern, deren Hauptkomponente z.B. Ammoniumsalze anstelle chaotroper Salze waren (kommerzielle Extraktionskits), bei Extraktionen genomicscher DNA aus unterschiedlichen komplexen Ausgangsmaterialien (z.B. Blut, Gewebe, Pflanzen) unter Konstanz der bisher üblichen anderen Reaktionskomponenten, Trägermaterialien sowie bei völlig gleichem Reaktionsablauf mindestens dieselben quantitativen sowie qualitativen Resultate erreicht werden.

Insbesondere das Ammoniumion stellt dabei chemisch-physikalisch in der Hofmeister-Serie das Ion dar, welches absolut entgegengesetzte Merkmale zu den bekannten chaotropen Ionen dieser Serie aufweist.

Allein durch den Austausch der bisher verwendeten chaotropen Salzkomponente durch eine antichaotische Salzkomponente im Lyse/Bindungspuffer bei bestehender Konstanz aller anderen Parameter, an die an sich bekannten festen Trägeroberflächen ist eine mindestens adäquate quantitative Isolierung von Nukleinsäuren möglich.

Das bedeutet, daß mit einem Salz welches Proteine nicht denaturiert, sondern stabilisiert, welches die Löslichkeit unpolarer Substanzen in Wasser nicht erhöht, sondern absenkt sowie welches hydrophobe Wechselwirkungen nicht zerstört, sondern verstärkt, es genauso

möglich ist, Nukleinsäuren, auch aus komplexen Ausgangsmaterialien zu isolieren, aufzureinigen und den an sich üblichen Applikationen zuzuführen.

5 Mit der vorliegenden Erfindung wird ein neuartiger, alternativer Mechanismus zur Bindung von Nukleinsäuren an feste vorzugsweise mineralische Trägermaterialien und auf dieser Basis ein universell anwendbares neuartiges Verfahren der Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien bereitgestellt.

10 Die Erfindung ermöglicht somit über die Verwendung der neuartigen Kompositionen von Lyse/Bindungspuffern auf der Basis von antichaotropen Salzen für die Nukleinsäureisolierung, speziell für die Isolierung genomicscher DNA, basierend auf der Bindung der Nukleinsäuren an die an sich gebräuchlichen unterschiedlichen festen Phasen aus Silica bzw. Glasmaterialien, die Nutzung eines alternativen Chemismus als essentielllem Bestandteil von entsprechenden Testkits (Formulierungen).

15

Das erfindungsgemäße Verfahren unter Einbeziehung von antichaotropen Salzen folgt dabei den von der praktischen Laborroutine bekannten Verfahrensabläufen für die Nukleinsäureisolierung und ist charakterisiert durch:

20 1. Lyse des Ausgangsmaterials  
2. Bindung der Nukleinsäuren an eine feste Phase  
(Zentrifugationssäule oder Suspension)  
3. Waschen der gebundenen Nukleinsäuren  
4. Elution der Nukleinsäuren mit einem an sich bekannten Niedrigsalzpuffer.

25

Die Erfindung ermöglicht eine hocheffiziente und schnelle Isolierung von Nukleinsäuren, besonders genomicsche DNA aus jedem beliebigen und ggf. komplexen Ausgangsmaterial. Die für die Bindung notwendigen antichaotropen Ionen können selbst bei Einbeziehung von proteolytischen Enzymen Bestandteil des Lyse/Bindungspuffers sein. Das erfindungsgemäße Verfahren ist damit einfach handhabbar und universell einsetzbar.

30 Die Realisierung der Nukleinsäureisolierung, insbesondere von DNA, aus beliebigen Ausgangsmaterialien erfolgt durch die Inkubation des die Nukleinsäure enthaltenden Ausgangsmaterials ohne Verwendung chaotoper Substanzen, die mit dem  
35 - Lyse/Bindungspuffersystem, welches eine wässrige Lösung umfaßt, die eine antichaotropen Salzkomponente, mindestens ein Detergenz, ggf. Zusatzstoffe und ggf. ein Enzym aufweist,

5 - und einer beliebigen festen Phase, vorzugsweise Glafaservliese, Glasmembranen, Gläser, Zeolithe, Keramik sowie andere Siliciumträger in Kontakt gebracht werden, wodurch die Lyse des Ausgangsmaterials und die nachfolgende Bindung der DNA an die feste Phase erfolgt. Anschließend wird die gebundene Nukleinsäure nach an sich bekannten Methoden gewaschen und die DNA von der festen Phase gelöst.

Bei bestimmten Extraktionsprotokollen kann der Lyseansatz ggf. mit einem zusätzlichen Detergenz, einem Alkohol oder einem Detergenz/Alkohol-Gemisch versetzt werden.

10 Bevorzugte Ausgangsmaterialien sind kompakte Pflanzenmaterialien, wie z.B. Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc., klinisch relevanten Proben, wie z.B. Vollblut; Gewebe, Mikrobioplate, paraffinierte Materialien, ercp-Proben, Tupfermaterial von Abstrichen, Lebensmittel, wie z.B. Fisch, Wurst, Konserven, Milch, forensischen Proben, wie z.B. Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren und andere Proben, die DNA enthalten.

15 15 Bevorzugte Ionen im Sinne der Erfindung sind die in der Hofmeister-Serie dargestellten antichaotropen Ammoniumionen, Cäsiumionen sowie Kalium- und Natriumionen oder Kombinationen dieser Ionen, vorzugsweise Ammoniumchlorid. Zur Lyse/Bindung werden sie in Ionenstärken von 0,1 M bis 8 M eingesetzt.

20 20 Für die Bindung der Nukleinsäuren, besonders von DNA an die festen Träger reichen dabei schon geringe Konzentrationen an diesen Salzen von vorzugsweise  $\leq 1$  M, bei bestimmten Applikationen bevorzugt sogar Konzentrationen  $\leq 0,5$  M, wobei für die quantitative Isolierung von Nukleinsäuren aus größeren Mengen an Ausgangsmaterialien höhere Ionenkonzentrationen erfolgreich sind.

30 30 Es können durch die Verwendung der antichaotropen Salze, die proteinstabilisierend wirken, als essentielle Bestandteile eines Lysepuffers in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung auch proteolytische Enzyme, wie z.B Proteinase K, zur Unterstützung und Effektivierung des Lyseprozesses, wodurch für den notwendigen Zellaufschluß auch hohe Ionenstärken der antichaotropen Salze z.B. 5 M zugesetzt werden, so daß eine quantitative Isolierung von Nukleinsäuren ermöglicht wird.

35 35 Puffersysteme des Standes der Technik mit den bekannten chaotropen Salze können bei den notwendigen hohen Ionenstärken, wie sie allgemein für eine quantitative Isolierung von Nukleinsäuren gefordert werden, keine proteolytischen Enzyme enthalten. Sie müssen somit immer nachträglich für die Bindung der Nukleinsäuren an die feste Phasen zugesetzt

werden.

Als Detergentien in den erfindungsgemäßen Lysepuffern/Bindungspuffern werden bevorzugt anionische, kationische oder neutrale, wie z.B. SDS, Triton X-100, Tween oder 5 CTAB eingesetzt.

Nach der erfolgten Lyse des Ausgangsmaterials wird die Suspension ggf. durch einen kurzen Zentrifugationsschritt von noch nicht vollständig lysierten Bestandteilen abgetrennt und mit dem DNA-bindenden Material direkt inkubiert bzw. wie schon beschrieben nach 10 Zugabe mit einem zusätzlichen Detergent, einem Alkohol oder einem Detergent/Alkohol-Gemisch mit der festen Phase inkubiert. Gegebenenfalls befinden sich im Lysepuffersystem zusätzlich geringe Konzentrationen (< 50 mM) an EDTA und/oder Tris-HCl. Für die Isolierung von DNA aus sehr stark verunreinigten Ausgangsmaterialien erfolgt bevorzugt auch der Zusatz von 2-4% Polyvinylpyrrolidon oder anderen bekannten 15 Substanzen zum Puffersystem zur selektiven Bindung von inhibitorischen Komponenten.

Als Bindungsmaterialien für die zu isolierende DNA haben sich z.B. kommerziell 20 verfügbare Glasfaservliese in Zentrifugationssäulen, Siliziumverbindungen wie SiO<sub>2</sub> unterschiedlicher Teilchengröße hervorragend bewährt. Damit können alle die Materialien verwendet werden, welche für die Isolierung von Nukleinsäuren mittels chaotroper Puffer genutzt werden.

Nach der Inkubation mit dem DNA-bindenden Material erfolgt die Abtrennung des Lysates vom Bindungsmaterial durch einen kurzen Zentrifugationsschritt. Nachfolgend 25 wird in an sich bekannter Weise mit einem Waschpuffer z.B. bestehend aus mindestens 50% Ethanol und gegebenenfalls einer geringen Salzkonzentration z.B. NaCl gewaschen, das Trägermaterial wird getrocknet und die gebundene DNA mittels eines an sich bekannten Niedrigsalzpuffers (Tris-HCl; TE; Wasser) und bei einer bevorzugten Temperatur von 50-70°C eluiert.

30 Eine weitere Ausführungsvariante der Erfindung besteht darin, daß zur Lyse von schwer aufschließbaren Ausgangsmaterialien, z.B. kompakten Gewebeproben, Haarwurzeln bzw. zur Optimierung der Lyseeffizienz und zur Reduzierung notwendiger Lysezeiten der Zusatz von proteolytischen Enzymen, vorzugsweise Proteinasen, wie z.B. Proteinase K, 35 erfolgt.

Die Erfindung ermöglicht somit auf neuartigen Kombinationen antichaotroper Salze als

essentiellen Bestandteilen von Lysepuffermixturen universell einsetzbare Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, aus allen DNA enthaltenden Ausgangsmaterialien wie auch aus beliebigen Mengen an unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien, wobei alle die bisher eingesetzten Trägermaterialien und deren Ausführungen genauso effizient eingesetzt werden können, wie auch die bisher praktizierten Vorschriften der Isolierung von Nukleinsäuren identisch nutzbar sind.

In seiner allgemeinsten Anwendungsvariante kann mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens aus allen dem Stand der Technik entsprechenden für eine DNA-Extraktion ausgewählten komplexen Ausgangsmaterialien eine Nukleinsäureextraktion durchgeführt werden, d.h. mittels des neuen universellen Puffersystem kann die hocheffiziente Lyse und nachfolgende Nukleinsäurebindung an einen mineralischen Träger aus kompakten Pflanzenmaterialien (z.B. Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc.), aus klinisch relevanten Proben (z.B. Vollblut; Gewebe, Mikrobioplate, paraffinierte Materialien, ercp-proben, Tupfermaterial von Abstrichen), aus Lebensmitteln (z.B. Fisch, Wurst, Konserven, Milch), aus forensischen Proben (z.B. Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren) wie auch aus anderen Ausgangsmaterialien erfolgreich, extrem einfach und sehr schnell durchgeführt werden.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht auch darin, daß die Isolierung von DNA dabei sowohl aus extrem geringen Ausgangsmaterialien (z.B. Isolierung von DNA aus 1 µl Vollblut; Haarwurzel, Mikrobiopsie < 1 mg) als auch aus sehr großen Mengen an Ausgangsmaterialien wie z.B. 50 ml Vollblut; 1 g Gewebematerial, <1g Pflanzenmaterial hocheffizient durchgeführt werden kann.

Weitere Vorteile der Ablösung chaotroper Salze durch antichaotrope Salze bestehen darin, daß die eingesetzten Puffer aufgrund des Fehlens der chaotropen Chemikalien auch nicht mehr toxisch oder ätzend wirken.

Neben einer allgemeinsten Ausführungsvariante erlauben Optimierungen des Extraktionsverfahrens bezogen auf spezifische Applikationen sogar eine fast quantitative Isolierung der in der Ausgangsprobe enthaltenen DNA-Mengen. Erstaunlicherweise können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ohne die nach dem Stand der Technik eingesetzten chaotropen Ionen hoher Konzentration für eine DNA-Bindung, höhere DNA-Ausbeuten erzielt werden, als dies mit kommerziell verfügbaren und hochoptimierten Extraktionskits bisher möglich ist.

Eine Auswahl diesbezüglicher Vergleichsergebnisse mit kommerziell verfügbaren Extraktionskits sind in den Ausführungsbeispielen dargestellt. Diese Ergebnisse demonstrieren eindeutig die Potentiale der Erfindung.

5 Neben der Isolierung von DNA aus allen DNA enthaltenden komplexen Ausgangsmaterialien, ermöglicht eine weitere Ausführungsvariante des erfindungsgemäßen Verfahrens auch die Isolierung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Lysaten hocheffizient und ohne den Einsatz von nach dem Stand der Technik zur Bindung der Plasmid DNA an mineralische Trägermaterialien an sich notwendigen chaotropen  
10 Salzen. So wird nach den dem Fachmann bekannten Verfahrensschritten der Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse die notwendige sog. Neutralisationsreaktion mittels der klassischen Solution III (Maniatis und Sambroek) durchgeführt und diese Solution III realisiert in einer damit bestehenden Dualfunktion auch gleichzeitig die Bindung der Plasmid-DNA an die an sich gebräuchlichen festen Träger. Für die Bindung  
15 der Plasmid-DNA bedarf es somit nicht dem gebräuchlichen Zusatz eines chaotropen Guanidiniumhydrochlorides.

Die gebundene Plasmid-DNA wird auch in an sich bekannter Art gewaschen und vom Trägermaterial eluiert. Das Verfahren eignet sich für die Isolierung von Plasmid-DNA aus  
20 allen Anwendung findenden Ausgangsmengen (Mini bis Giga). Die erhaltenen Ausbeuten an Plasmid-DNA sind dabei gegenüber mit herkömmlichen kommerziell verfügbaren Verfahren isolierten Ausbeuten identisch. Das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch in seiner Herstellung sehr viel preiswerter als alle anderen bekannten Systeme, denn chaotrop Salze sind sehr kostenintensiv.

25 Das Verfahren unter Verwendung antichaotoper Salze eignet sich somit auch hervorragend für die Konzipierung von automatisierbaren Systemen für die Plasmidisolierung, bei welchen bekanntermaßen der Preis/Präparationen ein entscheidendes Auswahlkriterium ist.

30 Die erfindungsgemäßen Formulierungen ermöglichen in überraschender Weise den Zugang zu weiteren hochinteressanten und neuartigen Applikationen auf dem Gebiet der Nukleinsäureisolierung und Diagnostik.

35 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind die vorliegenden neuen Lyse/Bindungspuffersysteme, die mindestens eine antichaotische Salzkomponente aufweisen, in der Lage Nukleinsäuren an feste Phasen zu binden, die eine negativ geladene

Oberfläche besitzen oder Oberflächen, die ein negatives Ladungspotential aufweisen.

Aus dem Stand der Technik sind Verfahren und Mittel zu Nukleinsäurereinigung bekannt, wobei die Nukleinsäurebindung an chemisch modifizierte feste Phasen erfolgt (United States Patent: 5,523,392; Purification of DNA on Aluminium Silicates and Phosphosilicates; United States Patent: 5,503,816; Silicates Compounds for DNA Purification; United States Patent: 5,674,997; DNA purification on modified Silicates; United States Patent: 5,438,127; DNA Purification by solid phase extraction using a  $\text{PCl}_3$  modified glass fiber membrane; United States Patent: 5,606,046: DNA purification by solid phase extraction using trifluometric acid washed glass fiber membrane; United States Patent: DNA purification by solid phase extraction using glass fiber membrane previously treated with trifluoroacetic acid, and then with fluoride ion, hydroxyd ion, or  $\text{BCL}_3$ ; United States Patent: 5,610,291: Glass fiber membranes modified by treatment with  $\text{SiCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ , or  $\text{BCl}_3$ , and washing with  $\text{NaOH}$  to set as a DNA adsorbant; United States Patent: 5,616,701: DNA purification by solid phase extraction using a hydroxide-washed glass fiber membrane; United States Patent: 5,650,506: Modified glass fiber membranes useful for DNA purification by solid phase extraction).

Bedingung für diese Nukleinsäurebindung ist dabei immer, daß die für die Bindung verwendeten Membranen durch chemische Modifizierungsreaktionen mit positiven Ionenladungen dotiert werden. Damit liegt auf der Hand, das es zwischen der positiv geladenen Oberfläche der eingesetzten Membranen und der negativen Ionenladung des Phosphatrückgrats von Nukleinsäuren durch Coulombsche Wechselwirkungen eine Bindung ergeben wird. Insofern wird das der Fachwelt hinlänglich bekannte Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an positive geladene feste Phasen genutzt, welches bekanntermaßen z.B. für DNA/RNA-Blotting-Techniken an positiv geladenen Nylon-Filtern schon viele Jahre eine Standardapplikation darstellt.

Ein ganz wesentlicher Nachteil dieser beschriebenen Verfahren besteht allerdings darin, daß diese nicht zur Nukleinsäureisolierung geeignet sind, d.h. es ist komplett unmöglich Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien zu isolieren. Ausgangsmaterial sind immer schon bereit isolierte Nukleinsäuren, welche wie in den zitierten US-Patentschriften dargestellt, in an sich bekannter Weise isoliert werden müssen. Insbesondere ein Aspekt erscheint dem Fachmann dabei unklar. Die beschriebenen Bindungsbedingungen (Bindung unter physiologischen Pufferbedingungen) und Elutionsbedingungen sind identisch. Es ist nicht zu ersehen wie unter denselben Pufferbedingungen zur Bindung der Nukleinsäuren an die positiv geladene Membran auch

wieder die Nukleinsäuren von der Membran abgelöst werden können.

Letzlich können die dargestellten Mittel und das dazugehörige Verfahren eine nur sehr enge praktische Anwendung besitzen. Bekannt sind auch synthetisch hergestellte Oligonukleotide an die positiven Oberflächen zu binden. Dies erfolgt dabei wiederum unter Ausnutzung Coulombscher Wechselwirkungen, d.h. auf der Basis der Verknüpfung 5 postiver und negativer Ladungen z.B. über modifizierte Oligonukleotide (Verknüpfung mit Aminolinkern oder Phosphatlinkern). Auch diese Varianten ermöglichen nicht die Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien.

10 Wie ausführlich dargestellt, existieren alternative Formen der Nukleinsäurebindung zur Reinigung an Membranen mit ausreichender positiver Ladung, die keine Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren darstellen. Die Bindung der Nukleinsäuren erfolgt durch Coulombsche Kräfte, basierend auf Wechselwirkungen zwischen positiven Ionenladungen der Membranen und der negativen Ionenladungen des Nukleinsäurenrückrats. Dieses 15 Prinzip erscheint damit logisch erklärbar.

Basierend auf der erfindungsgemäßen Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen

20 Ausgangsmaterialien mit antichaotropen Salzen wurde ein überraschendes Phänomen gefunden. So zeigte sich, daß sich auch negativ geladene Oberfläche oder Oberflächen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können, für die Bindung von Nukleinsäuren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Lyse/Bindungspuffersysteme eignen. Allgemein konnte eine solche Möglichkeit nicht erwartet werden, da keine 25 Bindung sondern eine Abstoßung auf Grund gleicher Ladungspotentiale eintreten müsste.

**Die erfindungsgemäß eingesetzten negativ funktionalisierten Oberflächen oder mit potentiell negativen Modifizierungen ausgestattete Oberflächen werden nach an sich bekannten Verfahren erzeugt. Als geeignet hat sich z.B. die photochemische 30 Kopplung einer Acetylgruppe, Carboxylgruppe oder Hydroxylgruppe an die Oberfläche eines Reaktionsgefäßes gezeigt.**

Mit der vorliegenden Verfahrensvariante ermöglichen sich völlig neue Perspektiven für eine komplexe Nukleinsäureanalytik. Es zeigte sich nämlich, daß für die Bindung der 35 Nukleinsäure an negative oder potentiell negative Oberflächen die Nukleinsäure wie bei allen bisher beschriebenen Varianten nicht schon isoliert sein muß. Die Bindung erfolgt aus dem Lysereaktionsansatz heraus, d.h. die die Nukleinsäure enthaltende Ausgangsprobe

wird lysiert und die frei werdenen Nukleinsäuren binden an die negativ geladene Oberfläche (z.B. an eine Mikrotestplattenkavität oder ein Eppendorf-Reaktionsgefäß).

Durch die erfindungsgemäße Verfahrensvariante können nunmehr völlig neuartige „Single

5 Tube“ und Einschritt-Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien realisiert werden. Solche Verfahren bieten in ihrem Anwendungsspektrum für die Nutzer riesige Vorteile (Einfachheit; Billigkeit; Reduzierung von Abfall, Schnelligkeit, Routinetauglichkeit, Automatisierbarkeit u.a.m.)

10 Eine weitere Anwendung dieser Verfahrensvariante besteht außerdem darin, nicht nur die Extraktion der Nukleinsäuren in einer Reaktionskavität zu realisieren, sondern auch eine folgende Targetamplifikation und ggf. nachfolgende Analytik im selben Reaktionsgefäß durchzuführen, ggf. Hybridisierungsreaktionen durchzuführen oder Sequenzierungen an festen Phasen ablaufen zu lassen.

15

Auf dieser Basis wird z.B. ein 0.5 ml Eppendorf PCR-Reaktionsgefäß mittels der Fachwelt bekannter Techniken mit einer negativ geladenen oder potentiell negativen funktionalen Gruppe modifiziert. Dazu eignet sich z.B. die photochemische Kopplung einer Acetylgruppe, Carboxylgruppe oder Hydroxylgruppe an die Oberfläche des

20 Reaktionsgefäßes. In das Reaktionsgefäß wird dann die für die Nukleinsäurenisolierung ausgewählte Probe gegeben (z.B. Vollblut) und mit einem Lysepuffer, enthaltend die antichaotrope Salzfraktion z.B. Ammoniumchlorid, ein Detergenz und ein proteolytisches Enzym versetzt und das Gefäß bei 70°C für 5 min inkubiert.

25 Zur Maximierung der Nukleinsäurenbindung kann nach der Lyse des Ausgangsmaterials noch ein Detergenz/Alkohol-Gemisch pipettiert werden. Der Ansatz wird dann für kurz inkubiert und nachfolgend aus dem Reaktionsgefäß abgegossen. Die Nukleinsäure befindet sich nun an der funktionalisierten Oberfläche des Reaktionsgefäßes gebunden und wird nachfolgend mit einem alkoholischen Waschpuffer kurz gespült und der Alkohol wird  
30 durch Inkubation bei z.B. 70°C entfernt. Die Elution der gebundenen Nukleinsäuren erfolgt weiter fachgemäß durch die Zugabe eines Niedrigsalzpuffers (z.B. 10 mM Tris-HCl) in das Reaktionsgefäß und eine kurze Inkubation (z.B. 2 min) bei z.B. 70°C. Die Nukleinsäure ist so für nachfolgende Verwendungen verfügbar.

35 Wie dargestellt laufen alle Reaktionen der Nukleinsäureisolierung aus einem komplexen Ausgangsmaterial in einem Reaktionsgefäß ab; d.h. Lyse des Ausgangsmaterials, Bindung der Nukleinsäuren; Waschen der gebundenen Nukleinsäuren und Elution der

Nukleinsäuren werden in und mit einem Reaktionsgefäß realisiert.

Die den momentan weltweit am Häufigsten genutzten Extraktionskits der Fa. Qiagen benötigen für die Abfolge von Lyse, Bindung, Waschen und Elution jeweils eine 5 Filterkartusche und mindestens 4 separate Reaktionsgefäße eingeschlossen sind desweiteren multiple Zentrifugationsschritte.

Das erfindungsgemäße Verfahrensvariante erlaubt im Gegensatz dazu die Extraktion der Nukleinsäure ohne einen einzigen Zentrifugationsschritt. Daraus lässt sich auch ein 10 enormer zeitlicher Vorteil ableiten. Diese Vorteile beziehen sich auch auf die beschriebenen Nukleinsäureextraktionsverfahren des zitierten US 5,234,809 von Boom.

Neben der möglichen Extraktion von Nukleinsäure kann die gebundene Nukleinsäure aber 15 auch an der Oberfläche des beschriebenen 0.5 ml Reaktionsgefäßes verbleiben und z.B. nachfolgend durch Zugabe eines kompletten PCR-Raktionsmixes (Primer, Nukleotide, Polymerasepuffer, Taq Polymerase, Magnesium) gleich für eine PCR-Applikation verwendet werden, d.h. Extraktion und Amplifikation laufen dann im selben Reaktionsgefäß ab.

20 Diese Beispiele illustrieren die enormen Vorteile und breite Anwendbarkeit, die aus der Erfindung ableitbar sind. Sie ermöglicht in einer Ausführungsvariante den kompletten Vorgang von Probenvorbereitung über Amplifikation und ggf. auch Analytik in z.B. einer Reaktionskavität. Damit ergeben sich mit der Bereitstellung von modifizierten Reaktionsgefäßen (oder auch anderen festen Oberflächen) und den geeigneten 25 Lyse/Bindungspuffern neue Standards in molekularbiologisch und vor allem Nukleinsäure-Diagnostik bearbeitenden Laboratorien, wobei durch die neuen potentiellen applikativen Lösungen vor allem auch die hinlänglich bekannten Probleme der Probenkontaminationen drastisch reduziert werden.

30 Ein weiterer Vorteil und auch eine weitere Applikation besteht darin, daß die oberflächenfixierten Nukleinsäuren an der Oberfläche auch zumindest längere Zeit stabil fixiert und somit für eine spätere Bearbeitung verfügbar sind, d.h. die PCR-Reaktion muß sich nicht zwingend sofort der Extraktion anschließen. Ein weiteres Anwendungsfeld ist die vollautomatisierte Nukleinsäureextraktion und ggf. Analytik unter Verwendung der 35 hier beschriebenen mit negativen oder mit potentiell negative Ladungen tragenden Oberflächen, vorzugsweise Plastikoberflächen geeigneter Reaktionskavitäten z.B. Mikrotestplatten).

Die erfindungsgemäßen Lyse/Bindungspuffersysteme mit den antichaotropen Salzen als Hauptkomponenten einschließlich ggf. eines proteolytischen Enzyms können auch als feste Formulierung bereitgestellt. Dazu werden die Mischungen aus Salzen und Detergenzien, Zusatzstoffen und ggf. Enzymen in gebräuchlichen Reaktionsgefäßchen aliquotiert und für mehrere Stunden bei 95 °C inkubiert oder nach an sich bekannten Verfahren lyophilisiert und so in eine feste Formulierung überführt.

Diese feste Formulierungen in fertigen komplexen Reaktionsmixen für die Nukleinsäureisolierung sind langzeitlagerstabil, d.h auch die biologische Aktivität der proteolytischen Enzymkomponente bleibt bei einer Langzeitlagerung (siehe Ausführungsbeispiel) bestehen. Die Herstellung der festen Formulierung von Lysepuffermixen erfolgte dabei ohne den Zusatz von an sich bekannten protektiven Zusatzstoffen, einfach durch eine Kältelyophilisierung.

Alle kommerziell angebotenen Testkits zur Nukleinsäurenextraktion enthalten die notwendigen Komponenten einzeln, bestimmte Lösungen müssen durch den Anwender erst hergestellt werden und darüber hinaus sind die Lösungen in ihrer Haltbarkeit eingeschränkt. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß der Nutzer während der Isolierung von Nukleinsäuren unter Verwendung z.Z. gebräuchlicher Testkits multiple Pipettierschritte für verschiedene Einzellösungen einhalten muß. Dies erhöht vor allem im Bereich der medizinischen Diagnostik das Kontaminationsrisiko dramatisch. Nachteilig ist ferner auch, daß durch die z.B. existierenden Beladungsgrenzen von weit gebräuchlichen Zentrifugationssäulchen, welche hauptsächlich für die Nukleinsäureisolierung angewendet werden, auch die Menge des Ausgangsmaterials stark begrenzt ist. Dies liegt darin begründet, daß zum Ausgangsmaterial noch die für die Extraktion notwendigen Lyse- und Bindungspuffer zugegeben werden müssen.

Durch die Bereitstellung einer festen Formulierung als lagerstabilier Lysemix auf der Basis antichaotroper Salze werden alle die bestehenden Probleme in ganz einfacher Form gelöst. Diese Formulierung hat folgende Vorteile:

1. Langzeitlagerung von „Ready to use“ Lysepuffermixen
2. Stabilisierung von proteolytischen Enzymen in fertigen Lysemixturen und deren Langzeitlagerung
3. Einsatz von größeren Mengen an Ausgangsmaterialien bei gleicher Dimensionierung

von bestehenden Zentrifugationssäulchen (z.B. Verdreifachung der Ausgangsmenge)

4. Reduzierung von Kontaminationsrisiken durch die Reduzierung von Pipettierschritten und Lösungen
5. Probenaufnahme im fertigen Lysemix auch außerhalb des Labors und deren ggf. Langzeitlagerung
6. stabiler Probenversand und Kühlung

Die fertigen festen, stabilen Lysepuffermixe bestehend aus einer Vielzahl von Einzelkomponenten; einschließlich ggf. proteolytischen Enzymen sind einfach handhabbar (auch von Personen ohne Sachkenntnisse), da die Reaktion einfach durch Zugabe einer Probe, die die zu isolierende Nukleinsäure enthält, gestartet wird. Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, daß die Mixturen entsprechend ihrer Inhaltstoffe Haltbarkeiten von mindestens 6 Monaten aufweisen, wodurch auch ein Transport der Probe bei Umgebungstemperatur kein Problem mehr darstellt.

Der Vorteil der festen Formulierungen basiert darauf, daß für die Lyse von Nukleinsäuren (NAs) enthaltenden Probenmaterialien eine diese NAs enthaltende Probe lediglich in das Reaktionsgefäß mit dem enthaltenden lagerstabilen Lysepuffer überführt wird und ggf. durch die Zugabe von Wasser, die Probe im jeweiligen Reaktionsgefäß lysiert wird.

Aufwendige und kontaminationsbelastende multiple Pipettierschritte entfallen gänzlich. Vor allem für die Sammlung und Aufarbeitung von klinischen und forensischen Proben unter Feldbedingungen sind durch die erfindungsgemäße Formulierung die bekannten Probleme gelöst und es steht eine einfach zu handhabende Formulierung zur Verfügung.

Überaschenderweise zeigte sich dann ebenfalls in der praktischen Durchführung, daß nach Zugabe des zu lysierenden Ausgangsmaterials ggf. bei Zugabe einer festen Probe nach Zugabe von H<sub>2</sub>O die feste Formulierung unter Standardreaktionsbedingungen problemlos wieder in eine flüssige Phase überführbar ist.

Zusammenfassend sei festzustellen:

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung antichaotroper Salze in Formulierungen ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien. Die Formulierungen enthalten Lyse/Bindungspuffersysteme, die mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweisen, eine feste Phase und an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer.

Das Lyse/Bindungspuffersystem kann als wässrige Lösung vorliegen oder als feste

Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäß.

Als feste Phase können alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotoper Reagentien Anwendung finden, vorzugsweise Glastaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger und Aerosile oder Trägermaterialien, die eine negativ geladene Oberfläche besitzen oder chemisch modifizierte Oberflächen aufweisen, die in ein negatives Ladungspotential besitzen.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung der genannten Formulierungen, das durch Lyse des Ausgangsmaterial, Bindung der Nukleinsäuren an ein Trägermaterial, Waschung der am Träger gebundenen Nukleinsäuren und Elution der Nukleinsäuren gekennzeichnet ist.

Aufgrund der erzielten DNA-Qualität ist es auch zur präparativen Isolierung und Aufreinigung für DNA zum Einsatz in der Gentherapie gut geeignet.

Gegenstand der Erfindung sind auch lagerstabile und einsatzfertige feste Formulierung von Lysepuffersystemen für die Nukleinsäureisolierung auf der Basis antichaotoper Salzen, die als „Ready-to-Use“-Mixe einsatzfertig in konventionellen Reaktionsgefäß vorliegen. Die festen Formulierungen der Lysepufferansätze werden durch die Zugabe von lediglich der Probe (bei flüssigen Proben wie z.B. Vollblut, Speichel, Zellsuspensionen, Serum, Plasma, Liquor), bei festen Ausgangsmaterialien wie Gewebe, Haarwurzeln, Blutspuren an festen Oberflächen, Zigarettenkippen deparaffiniertes Gewebe u.a.m. zusätzlich durch Zugabe von Wasser aktiviert und realisieren die Lyse des Ausgangsmaterials. Nach erfolgter Lyse des Ausgangsmaterials wird der Lyseansatz in an sich bekannter Weise ggf. nach Zugabe einer ethanolischen Lösung bzw. eines Alkohol/Detergenz-Gemisches mit den Verwendung findenden nukleinsäurebindenden festen Phasen jeglicher Form (Suspension, Zentrifugationssäulchen) inkubiert. Die nachfolgende Bindung der Nukleinsäuren an die jeweiligen festen Phasen, das Waschen der gebundenen Nukleinsäuren und die finale Elution erfolgen wie schon beschrieben nach dem Stand der Technik.

Mit diesen festen Formulierungen sind neuartige Lösungen vor allem für die Anwendungsgebiete jeglicher Form von Nukleinsäurediagnostik gegeben.

Hervorgehoben werden soll noch einmal, daß die Erfindungsvariante in einem Einschritt-Verfahren und in einem „Single Tube“-Verfahren die Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien, ggf. Targetamplifikationen und ggf. nachfolgende Analytik des amplifizierten Nukleinsäureabschnittes ermöglicht. Ausgangsmaterial muß

dabei nicht eine schon isolierte Nukleinsäure sein, sondern ist das komplexe die Nukleinsäure enthaltende Ausgangsmaterial. Die für die Bindung der Nukleinsäure benötigte Oberfläche enthält negative oder potentiell negative funktionale Gruppen. Die Bindung der Nukleinsäure wird in einem Lyse/Bindungspuffer realisiert, wobei die für die Bindung der negativ geladenen Nukleinsäure an die negative funktionalisierte Oberfläche benötigten Ionen aus antichaotropen Salzen stammen.

5 Damit sind realisierbar:

1. „Single Tube“-Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien
- 10 2. „Single Tube“-Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien und nachfolgende Targetvervielfältigung
3. „Single Tube“-Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien, nachfolgende Targetvervielfältigung und nachfolgende Analytik des vervielfältigten Nukleinsäureabschnittes.

15

Das bedeutet sowohl Nukleinsäure-Isolierung aus unterschiedlichsten DNA enthaltenen Ausgangsmaterialien ggf. Targetvervielfältigung und ggf. Analytik finden in ein und der selben Reaktionskavität oder ggf. auf ein und der selben Reaktionsoberfläche statt.

20 Die erfindungsgemäßen Formulierungen und das universelle Verfahren zur Bindung von Nukleinsäuren an festen Phasen zur Isolierung, Aufreinigung und nachfolgenden komplexen molekularen Analytik von Nukleinsäuren aus beliebigen Ausgangsmaterialien und Mengen, welche Nukleinsäuren enthalten, stellen eine neuartige Plattformtechnologie für die Entwicklung von integrativen vollautomatisierbaren genanalytischen Systemen dar, 25 die es ermöglichen, Probenvorbereitung, Targetvervielfältigung und Targetanalytik in einer Reaktionskavität zu realisieren.

Die Erfindung wird anschließend an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

30

### **1. Isolierung genomischer DNA aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien**

Jeweils 50-100 mg des pflanzlichen Ausgangsmaterials wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert und nachfolgend in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

5 Zugabe von 500µl Lysepuffer (2% CTAB; 2% Polyvinylpyrrolidon, 10mM Tris-HCl; 20mM EDTA und 1,3 M Ammoniumchlorid) und Inkubation für mindestens 30 min bei 65°C.

Abzentrifugieren unlysiertes Material und Mischen des Überstandes mit 200µl Isopropanol.

Überführen der Lösung auf eine Zentrifugationssäule mit einer Glasfasermembran (Micro Spin Säule; Fa. LIDA).

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm. Verwerfen des Filtrates und 2 maliges Waschen der Membran mit einem Waschpuffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; 70% v/v Ethanol).

Nach Ethanolentfernung durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (12.000 rpm für 2min)

15 Zugabe von 200µl eines Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl; pH 8,7) und Elution der DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm.

Jeweils 20µl der eluierten DNA wurden auf ein Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt (Abbildung 1)

20

### **2. Simultane Isolierung genomischer DNA aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien mit einem Universalpuffersystem**

Für die Isolierung wurden folgende Proben eingesetzt:

25 1-Vollblut gefroren; 50µl, 2-Vollblut; 100µl, 3-Gurke; 50 mg, 4-Tomatenpflanzenblatt; 100 mg; 5-Speichelprobe; 100µl, 6-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 5mg, 7-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 20mg, 8-Haarwurzel, 9-Putensalami; 50mg, 10-Eibe, Nadeln, 100mg Alle Proben wurden in 500µl Lysepuffer (2% CTAB; 2% Polyvinylpyrrolidon, 10mM Tris-HCl; 20mM EDTA und 1,3 M Ammoniumchlorid) und mit Ausnahme aller pflanzlichen 30 Proben unter Zugabe von 20µl Proteinase K (20mg/ml) bei 65°C inkubiert.

Die Lysate wurden nachfolgend mit 200µl Isopropanol versetzt und auf eine Zentrifugationssäule mit einer Glasfasermembran (Micro Spin Säule; Fa. LIDA) überführt.

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm. Verwerfen des Filtrates und 2 maliges Waschen der Membran mit einem Waschpuffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; 70% v/v Ethanol). Nach Ethanolentfernung durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (12.000 rpm für 2min) Zugabe von 50-200µl eines Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl; pH 8,7) und Elution der DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm.

Jeweils 1/5 der eluierten DNA wurden auf ein Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt (Abbildung 2).

5 **3. Isolierung genomicscher DNA aus Tupferproben aus Abstrichen der Mundschleimhaut**

Die Isolierung der DNA aus Tupferproben von Abstrichen der Mundschleimhaut ist nachfolgend beschrieben.

10 Jeweils 400 µl Lyepuffer (CTAB, Polyvinylpyrrolidone, Ammoniumchlorid, Tris, EDTA) wurde in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In diesen Lysepuffer wurde der Tupfer mit dem Abstrichmaterial ausgedrückt und der Suspension 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Nachfolgend wurde der Ansatz bei 70°C für 10 min inkubiert  
15 Nach Lyse wurden 200 µl eines Detergenz/Isopropanol-Gemisches zugegeben, die Probe kurz geschüttelt, nachfolgend auf eine kommerziell verfügbare Zentrifugationssäule (Fa. LIDA; Glasfasermembran) überführt und für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.  
Die Säule wurde dann zweimal mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer (NaCl, Tris-HCl; EDTA, Ethanol) gewaschen (zentrifugation bei 12.000 rpm; 1 min) und die Membran durch einen kurzen Zentrifugationsschritt getrocknet. Durch Zugabe von 200 µl  
20 Elutionspuffer  
(10 mM Tris-HCl) wurde die gebundene DNA von der Filtermembran durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (10,000 rpm; 1 min) eluiert.  
Jeweils 20 µl der isolierten DNA aus beiden Extraktionsverfahren wurde zur Analyse auf ein 0.7% TAE-Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung analysiert  
25 (Abbildung 3).

4. Vergleich der erfindungsgemäßen DNA Extraktion aus Vollblutproben (200 µl) mit einem kommerziellen Kit auf der Basis der Bindung der Nukleinsäuren unter Anwesenheit chaotroper Salze

30 Verglichen wurde die Isolierung genomicscher DNA mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einem kommerziell verfügbaren und herkömmlich genutzten Verfahren zur Isolierung genomicscher DNA unter Nutzung chaotroper Salze zur Nukleinsäurenbindung.  
Die Extraktion genomicscher DNA mittels des Vergleichsverfahrens erfolgte anhand der  
35 Anwendungsvorschrift.

Die Isolierung der DNA mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nachfolgend

beschrieben.

Jeweils 200 µl einer Vollblutprobe (EDTA behandelt; frisch) wurde in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nach Zugabe von 350 µl eines Lysepuffers (CTAB, Polyvinylpyrrolidone, 5 Ammoniumchlorid, Tris, EDTA) und 20 µl Proteinase k (20 mg/ml) erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 10 min zur Lyse des Ausgangsmaterials.

Nach Lyse wurden 180 µl eines Detergenz/Isopropanol-Gemisches zugegeben, die Probe kurz geschüttelt, nachfolgend auf eine kommerziell verfügbare Zentrifugationssäule (Fa. LIDA; Glasfasermembran) überführt und für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.

10 Die Säule wurde dann zweimal mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer (NaCl, Tris-HCl; EDTA, Ethanol) gewaschen (zentrifugation bei 12.000 rpm; 1 min) und die Membran durch einen kurzen Zentrifugationsschritt getrocknet. Durch Zugabe von 200µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl) wurde die gebundene DNA von der Filtermembran durch einen kurzen Zentrifugationsschritt ( 10,000 rpm; 1min) eluiert.

15 Jeweils 10 µl der isolierten DNA aus beiden Extraktionsverfahren wurde zur Analyse auf ein 0.7% TAE-Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung analysiert.

Verglichen wurde die Ausbeuten an genomischer DNA, deren Integrität (saubere Einzelbande ohne niedermolekulare Schmierbanden) und die Reproduzierbarkeit der Extraktionsverfahren. Wie zu ersehen können mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens 20 bessere Ergebnisse als mittels des Vergleichsverfahrens erreicht werden (Abbildung 4).

**5. Vergleich der erfindungsgemäßen DNA Extraktion aus Vollblutproben (5 µl) mit einem kommerziellen Kit auf der Basis der Bindung der Nukleinsäuren unter 25 Anwesenheit chaotroper Salze**

Verglichen wurde die Isolierung genomischer DNA mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einem kommerziell verfügbaren und herkömmlich genutzten Verfahren zur Isolierung genomischer DNA unter Nutzung chaotroper Salze zur Nukleinsäurenbindung.

30 Die Extraktion genomischer DNA mittels des Vergleichsverfahrens erfolgte anhand der Anwendungsvorschrift.

Die Isolierung der DNA mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nachfolgend beschrieben.

Jeweils 5 µl einer Vollblutprobe (EDTA behandelt; frisch) wurde in ein 1.5 ml Eppendorf- 35 Reaktionsgefäß überführt.

Die Probe wurde durch Zuabe von 195 µl 1xPBS Puffer auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 350 µl eines Lysepuffers (CTAB, Polyvinylpyrrolidone,

Ammoniumchlorid, Tris, EDTA) und 20 µl Proteinase K (20mg/ml) erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 10 min zur Lyse des Ausgangsmaterials.

Nach Lyse wurden 180 µl eines Detergenz/Isopropanol-Gemisches zugegeben, die Probe kurz geschüttelt, nachfolgend auf eine kommerziell verfügbare Zentrifugationssäule (Fa.

5 LIDA; Glasfasermembran) überführt und für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.

Die Säule wurde dann zweimal mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer (NaCl, Tris-HCl; EDTA, Ethanol) gewaschen (Zentrifugation bei 12.000 rpm; 1 min) und die Membran durch einen kurzen Zentrifugationsschritt getrocknet. Durch Zugabe von 200µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl) wurde die gebundene DNA von der Filtermembran 10 durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (10,000 rpm; 1min) eluiert.

10 Jeweils 20 µl der isolierten DNA aus beiden Extraktionsverfahren wurde zur Analyse auf ein 0.7% TAE-Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung analysiert.

Nachgewiesen und verglichen wurde die Möglichkeit der Isolierung genomicscher DNA aus sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial und die Reproduzierbarkeit der 15 Extraktionsverfahren. Wie zu ersehen können mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens bessere Ergebnisse als mittels des Vergleichsverfahrens erreicht werden (Abbildung 5).

**6. Vergleich der erfindungsgemäßen DNA Extraktion aus unterschiedlichen Arten tierischer Gewebeproben und unterschiedlicher Mengen an Ausgangsmaterial mit 20 einem kommerziellen Kit auf der Basis der Bindung der Nukleinsäuren unter Anwesenheit chaotoper Salze**

Verglichen wurde die Isolierung genomicscher DNA mittels des erfindungsgemäßen 25 Verfahrens mit einem kommerziell verfügbaren und herkömmlich genutzten Verfahren zur Isolierung genomicscher DNA unter Nutzung chaotoper Salze zur Nukleinsäurenbindung.

Die Extraktion genomicscher DNA mittels des Vergleichsverfahrens erfolgte anhand der Anwendungsvorschrift.

Die Isolierung der DNA mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nachfolgend beschrieben.

30 Jeweils 5 mg bzw. 20 mg von Gewebeproben aus Schweineniere, Schweineherz und Schweineleber wurden in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Der Probe wurden 400 µl eines Lysepuffers (CTAB, Polyvinylpyrrolidone, Ammoniumchlorid, Tris, EDTA) und 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben.

Die Lyse des Ausgangsmaterials erfolgte durch Inkubation bei 52°C .

35 Nach der Lyse wurden durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (14.000 rpm; 1 min) eventuell nicht lysierte Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µl eines Detergenz/Isopropanol-Gemisches zugegeben, die Probe

kurz geschüttelt, nachfolgend auf eine kommerziell verfügbare Zentrifugationssäule (Fa. LIDA; Glasfasermembran) überführt und für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann zweimal mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer (NaCl, Tris-HCl; EDTA, Ethanol) gewaschen (Zentrifugation bei 12.000 rpm; 1 min) und die Membran 5 durch einen kurzen Zentrifugationsschritt getrocknet. Durch Zugabe von 200 $\mu$ l Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl) wurde die gebundene DNA von der Filtermembran durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (10,000 rpm; 1min) eluiert. Jeweils 10  $\mu$ l der isolierten DNA aus beiden Extraktionsverfahren wurde zur Analyse auf 10 ein 0.7% TAE-Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung analysiert. Nachgewiesen und verglichen wurde die Möglichkeit der Isolierung genomicscher DNA aus verschiedenen Gewebeproben sowie verschiedener mengen an Ausgangsmaterial 15 hinsichtlich der Ausbeuten an genomicscher DNA, deren Integrität (saubere Einzelbande ohne niedermolekulare Schmierbanden) und der Reproduzierbarkeit der Extraktionen. Wie zu ersehen können mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens bessere Ergebnisse als 15 mittels des Vergleichsverfahrens erreicht werden (Abbildung 6).

**7. DNA Extraktion aus Vollblutproben (200  $\mu$ l) mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens und Bindung der Nukleinsäuren an verschiedene für die Bindung unter Vermittlung chaotroper Salze eingesetzter Trägermaterialien**

Dargestellt wird die Isolierung genomicscher DNA mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens aus 200  $\mu$ l Vollblut und die Bindung der Nukleinsäuren an für die Isolierung von Nukleinsäuren mittels chaotroper Agentien Verwendung findenden verschiedenen 25 Trägermaterialien (Säulenmembranen und Suspensionen).

Die Extraktion der DNA erfolgte wie in Ausführungsbeispiel 4 beschrieben, wobei anstelle der Glasfasemembran der Fa. LIDA verschiedene weitere Trägermaterialien eingesetzt wurden.

Jeweils 20  $\mu$ l der isolierten DNA wurde zur Analyse auf ein 0.7% TAE-Agarosegel 30 geladen und nach Ethidiumbromidfärbung analysiert.

Wie in der Abbildung 7 zu ersehen, realisiert das erfindungsgemäße Verfahren die Bindung der Nukleinsäuren an für die bisher bekannten chaotropen Verfahren eingesetzten unterschiedlichen Trägermaterialien.

**8. Herstellung eines lagerstabilen Lysepuffersystems einschließlich eines proteolytischen Enzyms (Puffermix 1) und Verwendung des Lysepuffersystems für die Isolierung genomischer DNA aus verschiedenen Ausgangsmaterialien**

5

Herstellung einer Lysepufferstammlösung enthaltend 3M Kaliumchlorid, 2% CTAB; 18,2 mM Tris-HCl (pH 8.3), 12,5 mM EDTA; 2,8% Polyvinylpyrrolidone. Aliquotieren von jeweils 400 µl der Stammlösung in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß und Zugabe von 40µl Proteinase K (20mg/ml).

10 Lyophilisation der Lysepuffermixturen in einer Lyophilisationsanlage (Alpha 2; Fa. Christ).

Nachfolgende Lagerung der Lysepuffermixturen in verschlossenen Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur für 6 Monate.

15 Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte aus:

A: 500µl Vollblut

B: 400 µl Speichelprobe

C: Deparaffiniertem Gewebematerial.

20 1. DNA Extraktion aus Vollblut

Zugabe der 500 µl Vollblut auf die feste Formulierung des Lysepuffers und Inkubation bei 70°C für 10 min. Zugabe von 200µl Isopropanol und Überführung der Suspension auf eine Zentrifugationssäule (Glasfaserflies).

Zentrifugation für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit und verwerfen des Zentrifugates.

25 Zugabe von 600 µl eines Waschpuffers (70% Ethanol, NaCl, Tris, EDTA), Zentrifugation für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit und verwerfen des Zentrifugates. Wiederholung des Waschschriften. Nachfolgend Trocknung der Membran durch Zentrifugation für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit.

Elution der DNA von der Membran durch Zugabe von 200 µl eines Elutionspuffers (70°C) und Zentrifugation für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit.

2. DNA Extraktion aus Speichelproben

Zugabe der 500 µl Speichelprobe auf die feste Formulierung des Lysepuffers und Inkubation bei 70°C für 10 min. Zugabe von 200µl Isopropanol und Überführung der Suspension auf eine Zentrifugationssäule (Glasfaserflies).

Zentrifugation für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit und Verwerfen des Zentrifugates.

Zugabe von 600 µl eines Waschpuffers (70% Ethanol, NaCl, Tris, EDTA), Zentrifugation

für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit und Verwerfen des Zentrifugates. Wiederholung des Waschschriften. Nachfolgend Trocknung der Membran durch Zentrifugation für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit.

5 Elution der DNA von der Membran durch Zugabe von 200 µl eines Elutionspuffers (70°C) und Zentrifugation für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit.

### 3. DNA Extraktion aus deparaffiniertem Gewebe

Zugabe des deparaffinierten Gewebestückchens auf die feste Formulierung des Lysepuffers, Zugabe von 500 µl ddH<sub>2</sub>O und Inkubation bei 52°C für 30 min.

10 Zugabe von 200µl Isopropanol und Überführung der Suspension auf eine Zentrifugationssäule (Glasfaserflies).

Zentrifugation für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit und Verwerfen des Zentrifugates.

Zugabe von 600 µl eines Waschpuffers (70% Ethanol, NaCl, Tris, EDTA), Zentrifugation für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit und Verwerfen des Zentrifugates. Wiederholung des Waschschriften. Nachfolgend Trocknung der Membran durch Zentrifugation für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit.

15 Elution der DNA von der Membran durch Zugabe von 200 µl eines Elutionspuffers (70°C) und Zentrifugation für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit.

20 Die extrahierte DNA wurde anschließend geelektrophoretisch analysiert.

Dazu wurden jeweils 1/10 des Gesamteluates an DNA aufgetragen (Abb. 8).

### 9. Herstellung eines lagerstabilen Lysepuffersystems einschließlich Proteinase K

25 (Puffermix 2) und Verwendung des Lysepuffersystems für die Isolierung genommischer DNA aus 8 individuellen 100 µl Vollblutproben

30 Herstellung einer Lysepufferstammlösung enthaltend 3 M Ammoniumchlorid; 2% Polyvinylpyrolidone; 16,7 mM EDTA; 60 mM Tris-HCl; 1,6 % CTAB; 20 µl Proteinase K-(20 mg/ml).

Aliquotieren von jeweils 400 µl der Stammlösung in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß und Inkubation der geöffneten Eppendorf-Reaktionsgefäß in einem Thermomixer bei 95°C bis zur vollständigen Eintrocknung. Nachfolgend Verschließen der Reaktionsgefäß und Lagerung für 12 Monate bei Raumtemperatur.

35

### DNA Extraktion aus Vollblut

Zugabe der 100 µl Vollblut auf die feste Formulierung des Lysepuffers und Inkubation bei

70°C für 10 min. Zugabe von 20 µl einer mineralischen Carrier Suspension auf Silicabasis und kurzes Mixen. Inkubation des Ansatzes für 1 min. Pelletierung des Trägermaterials durch kurzes Anzentrifugieren. Waschen des Trägerpellets mit 800 µl eines Waschpuffers (70% Ethanol, NaCl, Tris, EDTA) und nachfolgende Entfernung des restlichen Ethanols 5 durch Inkubation bei 70°C. Elution der DNA vom Trägermaterial durch Zugabe von 200 µl eines auf 70°C erwärmt Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl; pH 8,69 und Abtrennung der Nukleinsäure vom Trägermaterial durch 1 minütige Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit für 1min sowie Überführung der Nukleinsäure in ein neues Reaktionsgefäß. Die extrahierte DNA wurde anschließend geelektrophoretisch analysiert.

10 Dazu wurden jeweils 1/10 des Gesamteluates an DNA aufgetragen (Abb. 9).

**10. Isolierung genomischer DNA aus peripheren Blutlymphocyten durch direkte Bindung an funktionalisierte Oberflächen einer Mikrotestplatte**

15

Als Mikrotestplatte wurde eine kommerziell verfügbare Platte mit einer COO<sup>-</sup> Gruppenbelegung verwendet.

Jeweils ein Streifen der Platte (8-Wellen) mit funktionellen Gruppen und eine Streifen ohne COO<sup>-</sup>Gruppen als Negativkontrolle wurde für die Isolierung verwendet.

20

Alle Wells wurde mit 30 µl peripherer Blutlymphocyten in 1 x PBS Puffer beladen und mit 180µl eines Lysepuffers (Ammoniumchlorid; CTAB; Polivinylpyrrolidone, Tris-HCl; EDTA; Proteinase K) versetzt und bei 70°C für 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 80 µl eines Detergenz/Isopropanol-Gemisches. Die Ansätze wurden kurz geschüttelt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösungen aus den Wells 25 abgegossen. Jedes Well wurde nachfolgend 2 x mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer gespült und der restliche Ethanol durch kurze Inkubation bei 70°C entfernt.

Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 25 µl 10mM Tris-HCl und einer Inkubation für 2 min.

Die Eluate wurde anschließend auf einem 0.7% Agarosegel ausgewertet. (Abbildung 10)

30

## Patentansprüche

1. Formulierungen ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien enthaltend

- 5 - ein Lyse/Bindungspuffersystem, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist,
- eine feste Phase,
- an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer.

10

2. Formulierungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die antichaotrope Komponente ein Ammonium-, Cäsium-, Natrium- und/oder Kaliumsalz ist, vorzugsweise Ammoniumchlorid.

15

3. Formulierungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem Detergentien und ggf. Zusatzstoffe aufweist.

20

4. Formulierungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Detergentien und Zusatzstoffe Tris-HCl, EDTA, Polyvinylpyrrolidone, CTAB, TritonX-100, N-Lauryl-Sarkosin, Natriumcitrat, DTT, SDS und/oder Tween sind.

25

5. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem zur Bindung an die feste Phase einen Alkohol aufweist.

30

6. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem Enzyme, vorzugsweise Protein-abbauende Enzyme, aufweist.

35

7. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem als wässrige Lösung vorliegt.

8. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem als feste lagerstabile Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäßern vorliegt.

9. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als feste Phase alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotoper Reagentien Anwendung finden, vorzugsweise Glatfaserliese, Glasmembranen, Gläser, Zeolith, Keramik, Siliciumträger.

5

10. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als feste Phase Trägermaterialien fungieren, die eine negativ funktionalisierte Oberfläche besitzen oder funktionalisierte Oberflächen aufweisen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können.

10

11. Formulierungen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des Trägermaterials mit einer Acetylgruppe, Carboxylgruppe oder Hydroxylgruppe modifiziert ist.

15

12. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung von Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial lysiert wird, die Bindung der Nukleinsäuren an eine feste Phase erfolgt, die am Träger gebundenen Nukleinsäuren gewaschen werden und die Elution der Nukleinsäuren erfolgt.

20

13. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man das DNA enthaltende Material mit einem

25

- Lyse/Bindungspuffersystem, umfassend eine wässrige Lösung, die eine antichaotische Salzkomponente, mindestens ein Detergent, ggf. Zusatzstoffe sowie ggf. ein proteolytisches Enzym enthält, und
- mit einer festen Phase ggf. unter Zusatz eines Alkohols in Kontakt bringt,
- anschließend wäscht und die Nukleinsäure von der festen Phase löst.

30

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß Ausgangsmaterialien kompakte Pflanzenmaterialien, wie Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc., klinisch relevante Proben, wie Vollblut; Gewebe, Mikrobioplate, paraffinierte Materialien, ercp-proben, Tupfermaterial von Abstrichen, Lebensmittel, wie Fisch, Wurst, Konserven, Milch, forensischen Proben, wie Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren und andere Proben, die DNA enthalten, sind.

35

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Ionenstärken der antichaotropen Salze zur Lyse/Bindung zwischen 0,1 und 8 M liegen.

16. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung von Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und 10 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß

- das Ausgangsmaterial in einem „Single Tube“- bzw. Einschritt-Verfahren mit einer negativ funktionalisierten Oberfläche oder dessen Oberfläche chemisch so modifiziert ist, daß sie in ein negatives Ladungspotential überführt werden kann, in Kontakt gebracht und lysiert wird,
- die Bindung der Nukleinsäure die Oberfläche erfolgt,
- die gebundene Nukleinsäure gewaschen und ggf. elutiert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß

15 negativ funktionalisierte Oberflächen entsprechend modifizierte planare Oberflächen, Filtermembranen, herkömmliche Plastikgefäß oder Mikrotestplatten sind.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure anschließend im gleichen Reaktionsansatz einer Amplifikationsreaktion ausgewählter 20 Sequenzabschnitte unterzogen und ggf. daran anschließend eine Analyse der Gensequenzen durchgeführt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure anschließend im gleichen Reaktionsansatz hybridisiert oder sequenziert wird.

25 20. Verwendung antichaotoper Komponenten in einem Lyse/Bindungspuffersystem zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase.

21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß antichaotrop 30 Komponenten Ammonium-, Calcium-, Natrium- und/oder Kaliumsalze sind, vorzugsweise Ammoniumchlorid.

22. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß zur 35 Lyse/Bindung die antichaotropen Salze in Ionenstärken von 0,1 bis zu 8 M eingesetzt werden.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß das

Lyse/Bindungspuffersystem als wässrige Lösung eingesetzt wird.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem als feste lagerstabile Formulierung vorliegt.

5

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 24 zur präparativen Isolierung und Aufreinigung für DNA zum Einsatz in der Gentherapie.

Abbildung 1

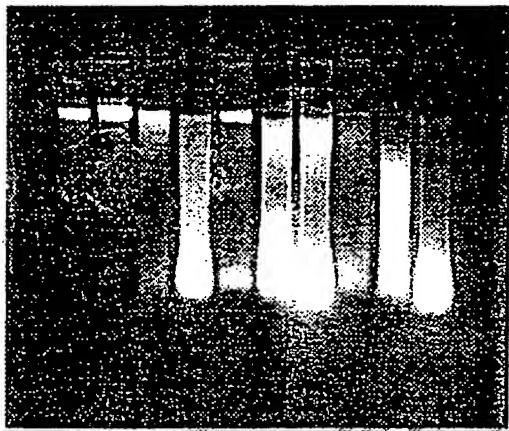
1 2 3 4 5 6 7 8

Spuren:

- 1-Zwiebel (frisch);
- 2-Schnittlauch (frisch; grün)
- 3-Schnittlauch (frisch; grün)
- 4-Geranie (hängend; Blüten und Blätter; frisch)
- 5-Geranie (stehend; Blätter; frisch)
- 6-Eibe (Nadeln; frisch)
- 7-Mäuseschwanzgras (frisch; Blätter; grün)
- 8-Reinfarn (frisch; grün; Blätter)

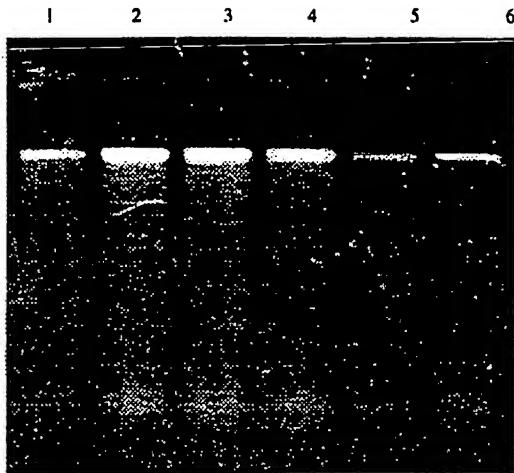
Abbildung 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

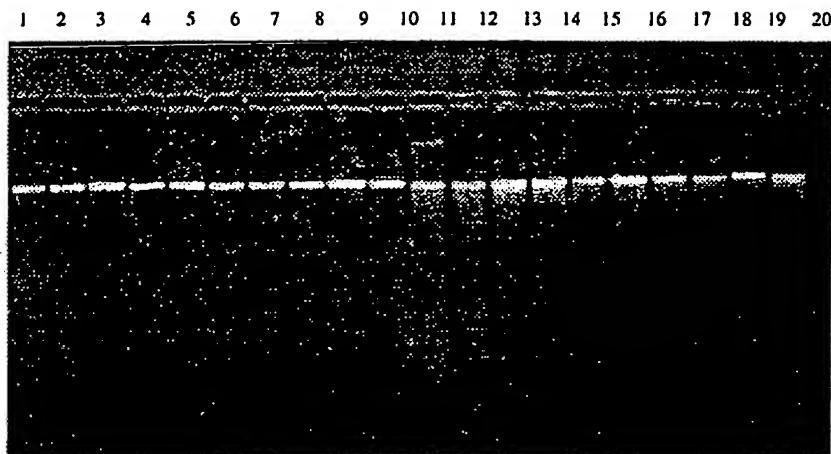
Spuren:

1-Vollblut gefroren; 50µl, 2-Vollblut; 100µl, 3-Gurke; 50 mg, 4-Tomatenpflanzenblatt; 100 mg; 5-Speichelprobe; 100µl, 6-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 5mg, 7-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 20mg, 8-Haarwurzel, 9-Putensalami; 50mg, 10-Eibe, Nadeln, 100mg

Abbildung 3



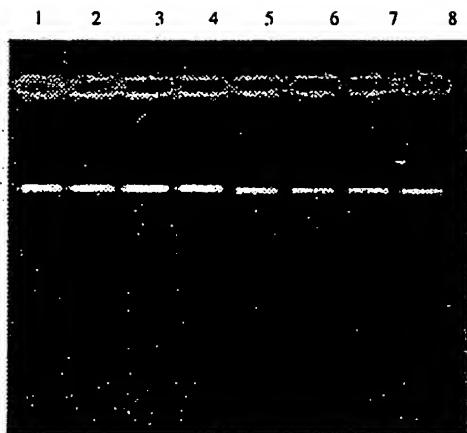
Spuren 1-6: DNA aus Astrichproben der Mundschleimhaut

Abbildung 4Spuren:

1- 10: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren

11-20: Vergleichsverfahren

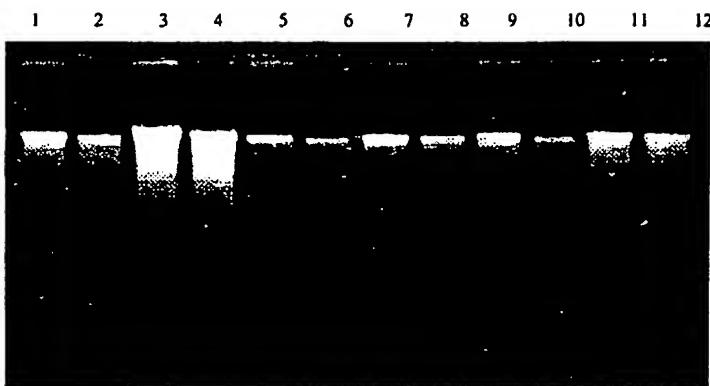
Abbildung 5



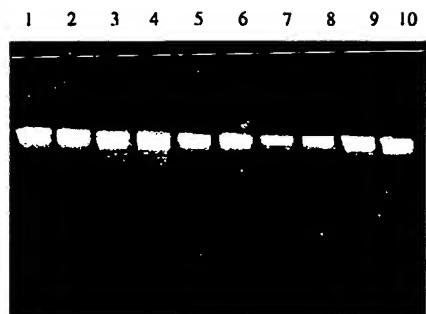
Spuren:

1- 4: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren

5- 8: Vergleichsverfahren

Abbildung 6Spuren:

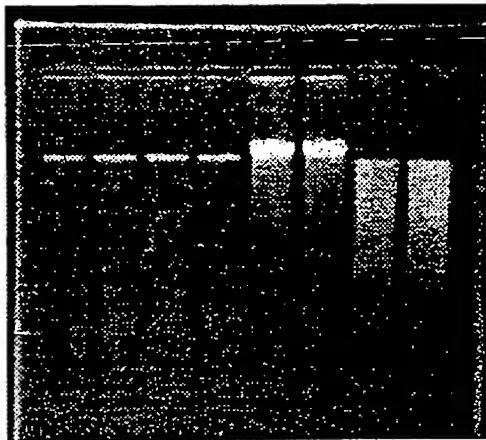
- 1: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren; 5 mg Niere
- 2: Vergleichsverfahren; 5 mg Niere
- 3: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren; 20 mg Niere
- 4: Vergleichsverfahren; 20 mg Niere
- 5: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren; 5mg Herz
- 6: Vergleichsverfahren; 5 mg Herz
- 7: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren; 20 mg Herz
- 8: Vergleichsverfahren; 20 mg Herz
- 9: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren; 5mg Leber
- 10: Vergleichsverfahren; 5 mg Leber
- 11: erfindungsgemäßes Extraktionsverfahren; 20 mg Leber
- 12: Vergleichsverfahren; 20 mg Leber

Abbildung 7Spuren:

- 1/2: Membran Anbieter A (kommerziell verfügbarer Extraktionskit)
- 3/4: Membran Anbieter B (kommerziell verfügbarer Extraktionskit)
- 5/6: Membran Anbieter C (kommerziell verfügbarer Extraktionskit)
- 7/8: Trägersuspension aus Siliziumdioxid
- 9/10: Trägersuspension aus Diatomenerde
- 11/12: Trägersuspension aus Aerosilen (200 m<sup>2</sup>/g )

Abbildung 8

1 2 3 4 5 6 7 8



Spuren:

- 1-4: DNA extrahiert aus Speichelproben
- 5-6: DNA extrahiert aus Vollblut
- 7-8: DNA extrahiert aus deparaffiniertem Gewebematerial

Abbildung 9

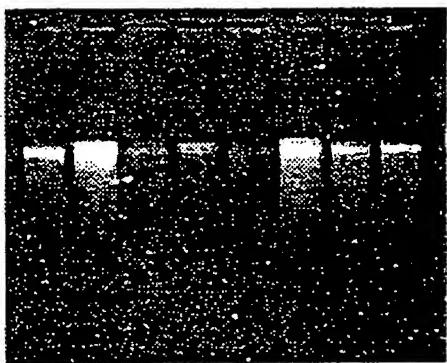
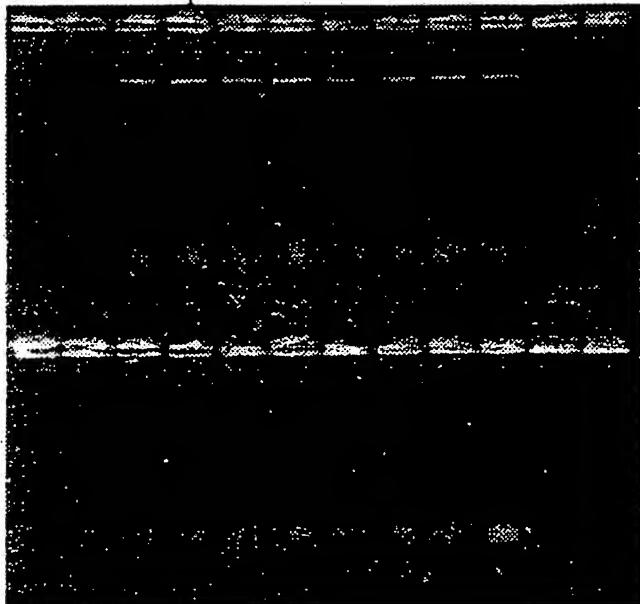


Abbildung 10

COO' Mikrotestplattenstreifen



unmodifizierter Mikrotestplattenstreifen

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 99/02248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 18905 A (UNIV NIJMEGEN ;KUPPEVELT ANTONIUS HENRICUS MI (NL); LEST CHRISTIAA) 20 June 1996 (1996-06-20) page 3, line 39 -page 7, line 36 ---</p> <p>EP 0 648 776 A (BECTON DICKINSON CO) 19 April 1995 (1995-04-19) page 2, line 50 - line 51 ---</p> <p>US 5 693 785 A (DOWN JAMES ARTHUR ET AL) 2 December 1997 (1997-12-02) abstract column 7, line 4 - line 8 ---</p> <p>EP 0 442 026 A (TALENT SRL) 21 August 1991 (1991-08-21) column 2, line 4 -column 3, line 9 ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
9 February 2000	16/02/2000	
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer	
<p>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016</p>	Hornig, H	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 99/02248

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 512 767 A (BECTON DICKINSON CO) 11 November 1992 (1992-11-11) abstract claims 1-10; example 4 ----	
A	EP 0 376 080 A (TALENT SRL) 4 July 1990 (1990-07-04) the whole document ----	
A	WO 95 34569 A (BENDZKO PETER ;HILLEBRAND TIMO (DE); INVITEK GMBH (DE); PETERS LAR) 21 December 1995 (1995-12-21) the whole document -----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Int'l Application No

PCT/DE 99/02248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9618905 A	20-06-1996	NL	9402122 A	01-07-1996
		AU	4124396 A	03-07-1996
		EP	0797778 A	01-10-1997
		JP	10512139 T	24-11-1998
EP 0648776 A	19-04-1995	US	5503816 A	02-04-1996
		DE	69421885 D	05-01-2000
		JP	7177886 A	18-07-1995
		US	5674997 A	07-10-1997
US 5693785 A	02-12-1997	US	5342931 A	30-08-1994
		AU	663915 B	26-10-1995
		AU	3303593 A	19-08-1993
		BR	9300567 A	17-08-1993
		CA	2089119 A	14-08-1993
		DE	69324716 D	10-06-1999
		DE	69324716 T	09-09-1999
		EP	0555798 A	18-08-1993
		JP	2608669 B	07-05-1997
		JP	6022762 A	01-02-1994
		MX	9300713 A	01-09-1994
EP 0442026 A	21-08-1991	IT	1240870 B	17-12-1993
		AT	132158 T	15-01-1996
		AU	7029691 A	15-08-1991
		CA	2019911 A	14-08-1991
		DE	69024477 D	08-02-1996
		DE	69024477 T	15-05-1996
		JP	5015373 A	26-01-1993
EP 0512767 A	11-11-1992	CA	2067711 A	04-11-1992
		DE	69212216 D	22-08-1996
		DE	69212216 T	02-01-1997
		JP	5268963 A	19-10-1993
		JP	7051065 B	05-06-1995
		SG	49924 A	15-06-1998
		US	5405951 A	11-04-1995
EP 0376080 A	04-07-1990	IT	1226210 B	21-12-1990
		CA	2006185 A	22-06-1990
WO 9534569 A	21-12-1995	DE	4422040 A	21-12-1995
		DE	4422044 A	21-12-1995
		DE	4447015 A	04-07-1996
		AT	184013 T	15-09-1999
		DE	59506735 D	07-10-1999
		EP	0765335 A	02-04-1997
		JP	10501246 T	03-02-1998

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02248

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
A	WO 96 18905 A (UNIV NIJMEGEN ;KUPPEVELT ANTONIUS HENRICUS MI (NL); LEST CHRISTIAA) 20. Juni 1996 (1996-06-20) Seite 3, Zeile 39 -Seite 7, Zeile 36 ---	
A	EP 0 648 776 A (BECTON DICKINSON CO) 19. April 1995 (1995-04-19) Seite 2, Zeile 50 - Zeile 51 ---	
A	US 5 693 785 A (DOWN JAMES ARTHUR ET AL) 2. Dezember 1997 (1997-12-02) Zusammenfassung Spalte 7, Zeile 4 - Zeile 8 ---	
A	EP 0 442 026 A (TALENT SRL) 21. August 1991 (1991-08-21) Spalte 2, Zeile 4 -Spalte 3, Zeile 9 ---	
		-/-

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "a" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
9. Februar 2000	16/02/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Hornig, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02248

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 512 767 A (BECTON DICKINSON CO) 11. November 1992 (1992-11-11) Zusammenfassung Ansprüche 1-10; Beispiel 4 ----	
A	EP 0 376 080 A (TALENT SRL) 4. Juli 1990 (1990-07-04) das ganze Dokument ----	
A	WO 95 34569 A (BENDZKO PETER ;HILLEBRAND TIMO (DE); INVITEK GMBH (DE); PETERS LAR) 21. Dezember 1995 (1995-12-21) das ganze Dokument ----	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02248

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9618905 A	20-06-1996	NL	9402122 A	01-07-1996
		AU	4124396 A	03-07-1996
		EP	0797778 A	01-10-1997
		JP	10512139 T	24-11-1998
EP 0648776 A	19-04-1995	US	5503816 A	02-04-1996
		DE	69421885 D	05-01-2000
		JP	7177886 A	18-07-1995
		US	5674997 A	07-10-1997
US 5693785 A	02-12-1997	US	5342931 A	30-08-1994
		AU	663915 B	26-10-1995
		AU	3303593 A	19-08-1993
		BR	9300567 A	17-08-1993
		CA	2089119 A	14-08-1993
		DE	69324716 D	10-06-1999
		DE	69324716 T	09-09-1999
		EP	0555798 A	18-08-1993
		JP	2608669 B	07-05-1997
		JP	6022762 A	01-02-1994
		MX	9300713 A	01-09-1994
EP 0442026 A	21-08-1991	IT	1240870 B	17-12-1993
		AT	132158 T	15-01-1996
		AU	7029691 A	15-08-1991
		CA	2019911 A	14-08-1991
		DE	69024477 D	08-02-1996
		DE	69024477 T	15-05-1996
		JP	5015373 A	26-01-1993
EP 0512767 A	11-11-1992	CA	2067711 A	04-11-1992
		DE	69212216 D	22-08-1996
		DE	69212216 T	02-01-1997
		JP	5268963 A	19-10-1993
		JP	7051065 B	05-06-1995
		SG	49924 A	15-06-1998
		US	5405951 A	11-04-1995
EP 0376080 A	04-07-1990	IT	1226210 B	21-12-1990
		CA	2006185 A	22-06-1990
WO 9534569 A	21-12-1995	DE	4422040 A	21-12-1995
		DE	4422044 A	21-12-1995
		DE	4447015 A	04-07-1996
		AT	184013 T	15-09-1999
		DE	59506735 D	07-10-1999
		EP	0765335 A	02-04-1997
		JP	10501246 T	03-02-1998